

IMPLEMENTACIJA DIREKTIVE EU 495/2015 U PRAĆENJU KVALITETA VODE DUNAVA

*Vojislava Bursić¹, Gorica Vuković², Zoran Stojanović³, Sonja Gvozdenac¹,
Tijana Zeremski⁴, Maja Meseldžija¹, Aleksandra Petrović¹*

Izvod: Direktiva EU 495/2015 na listu pesticida čije praćenje je neophodno u proceni ekološkog kvaliteta voda, uključuje i neonikotinoide. LC-MS/MS analizom uzoraka Dunava, detektovani su ostaci tiametoksama, acetamiprida i imidakloprida. Detektovanjem insekticida iz grupe neonikotinoida, ukazuje se na potrebu implementacije ove direktive pri praćenju kvaliteta vode.

Ključne reči: voda, Dunav, EU Direktive, neonikotinoidi, LC-MS/MS

Uvod

Problem zagađenja Dunava u pojedinim podunavskim zemljama postao je glavna tema rasprave brojnih naučnika i stručnjaka iz oblasti zaštite životne sredine. Nažalost, ovaj problem uočen je relativno kasno (krajem osamdesetih godina dvadesetog veka), nakon što su hemikalije u vodi izazvale nestanak mnogih akvatičnih organizama (Mladenović-Ranisavljević et al., 2012). Posebna pažnje je posvećena pesticidima koji mogu migrirati u površinske i podzemne vode, nakon aplikacije na biljke ili zemljište (Ismail et al., 2012). Neretko, poljoprivredni proizvođači nakon završenog prskanja, bacaju praznu ambalažu u lokalne kanale ili ih ostavljaju pored njive, što predstavlja još jedan izvor zagađenja (Bursić et al., 2013). Iako se pesticidi smatraju izuzetno toksičnim supstancama u životnoj sredini, veoma je malo informacija o njihovoj distribuciji i upotrebi u Srbiji (Antić et al., 2013).

U Evropskoj uniji prisustvo pesticida u vodi je regulisano različitim direktivama, poput Direktive 2006/118/EC koja se odnosi na zagađenje podzemnih voda. Direktiva 98/83/EC je u vezi sa kvalitetom vode namenjenoj ljudskoj upotrebi. Direktiva 2000/60/EC postavlja osnovu za zajedničko delovanje na polju politike vode (Water Framework Directive – WFD). WFD ima za cilj postizanje „dobrog hemijskog i ekološkog statusa u svim vodama” do 2020. godine. Okvirna direktiva o vodama Evropske unije (Water Framework Directive 2000/60/EC) predstavlja pravni okvir za zaštitu i poboljšanje kvaliteta svih vodnih resursa poput reka, jezera, podzemnih, priobalskih voda i drugih u Evropskoj uniji. Stupila je na snagu u decembru 2000. godine, prema kojoj su zemlje članice EU bile u obavezi da je inkorporiraju u svoje nacionalno zakonodavstvo do kraja 2003. godine. Od tada, neophodno je bilo sprovesti aktivnosti u cilju postizanja željenog „dobrog stanja” svih voda u Evropskoj uniji do

¹Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Trg Dositeja Obradovića 8, Srbija (bursicv@polj.uns.ac.rs);

²Gorica Vuković, Nebojša Vuković, Gradski zavod za javno zdravlje Beograd, Bulevar despota Stefana 54a, Beograd, Srbija;

³Republički hidrometeorolški zavod, Beograd;

⁴Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Maksima Gorkog 30, 21 000 Novi Sad.

kraja 2015. godine. To je naročito istaknuto činjenicom da se vode u Evropi suočavaju sa ovim problemima radi dobrobiti kako sadašnjih, tako i budućih generacija. Formirana je indikativna lista glavnih zagađivača: organohlorna jedinjenja i supstance koje mogu formirati takva jedinjenja u vodenoj sredini, organofosfati i drugi biocidi. Direktiva 2008/105/EC kao nastavak WFD-a postavlja ekološke standard za 41 opasnu supstancu u površinskim vodama, uključujući i pesticide definisane Aneks-om X. Anex X obuhvata listu prioriternih supstanci koje je potrebno pratiti u politici vode, koja obuhvata 33 zagađivača od kojih su 14 pesticidi (atrazin i njegovi metaboliti, izoproturon, simazin,...). Za pesticide koji nisu obuhvaćeni ovim aneksom, propisana je MCA (maximum allowable concentration) od 0.1 µg/L (ukupno 0.5 µg/L). Najnovija Direktiva koja je stupila na snagu u martu prošle godine, Direktiva EU 2015/495 proširuje listu pesticida koji se moraju pratiti u vodi. Ovom direktivom utvrđene su dodatne prioritne materije: oksadiazon (88 µg L⁻¹), metiokarb (10 µg L⁻¹) i neonikotinoidi (9 µg L⁻¹). Prema smernicama Direktive (EU) 2015/495 takozvane „Watch list” u vodi je neophodna kontrola insekticida iz grupe neonikotinoida. Neonikotinoidi su insekticidi novijeg datuma i u njih se ubrajaju imidakloprid, tiametoksam, acetamiprid, tiakloprid i klotianidin, kao i metabolit 6-hlor nikotinska kiselina.

U našem radu će biti analizirana voda iz Dunava sa dva lokaliteta u Novom Sadu, na sadržaj neonikotinoida, tečnom hromatografijom sa tandem masenom spektrometrijom (LC-MS/MS) uz atrazin-D5, izoproturon-D6 i karbofuran-D3 koji su korišćeni kao interni standardi.

Materijal i metode rada

Uzorkovanje. Uzorci za analizu vode uzeti su iz Dunava na dva lokaliteta u Novom Sadu (45°15'59.0"N 19°51'51.0"E i 45°26'63.85"N 19°86'41.61"E) van zone direktnog uticaja uliva otpadnih voda i pritoka, a u skladu sa smernicama za uzimanje uzoraka površinskih voda iz reka i potoka SRPS ISO 5667-6. Uzorkovanje je izvedeno 27.08., 03.09., 10.09. i 17.09.2015. godine. Voda je uzimana (500 mL) iz čamca od nizvodnog toka ka uzvodnom, bez hvatanja sedimenata.

Hemikalije i aparatura. Analitički standardi tiametoksama, acetamiprida i imidakloprida (Dr Erhnerstorfer), analitički standard atrazina-D5, izoproturona-D6, karbofurana-D3 (Pestanal, Fluka (Nemačka)), kao IS (interni standardi) masene koncentracije 1 µg mL⁻¹, metanol, HPLC čistoće (J.T. Baker, Holland), Dejonizovana voda, Azot 99,999% čistoće (Messer), Supelco manifold, OASIS HLB, 6 cc (Waters Corporation, USA), najlonski membranski filteri za špriceve, Econofilter (Agilent Technology), špricevi od 5 mL (Memina Krepost, Bulgaria), menzura od 250 mL.

Validacioni parametri. **Prinos ekstrakcije** je proveren za nivoe obogaćenja od 20, 100 i 200 ng L⁻¹ u tri ponavljanja uz dodavanje 100 µL IS. Ispitivanje koncentracije su postignute dodavanjem određene zapremine radnog rastvora masene koncentracije 10 µg mL⁻¹ u 250 mL česmenske vode. **Linearnost odziva detektora.** Provera linearnosti odziva detektora urađena je za interval masenih koncentracija od 0.01 do 1.0 µg mL⁻¹, tako što se u upareni ekstrakt (1 mL) dodavanje po 100 µL IS, a u zavisnosti od krajnje željene koncentracije se dodaje radni rastvor u količini od 200, 100, 50 i 20 µL i do

1000 μL dopunjenih mobilnom fazom. **Limit detekcije (LOD) i limit kvantifikacije (LOQ).** LOQ su zadate na osnovu regulative i eksperimentalnim putem potvrđene, obogaćivanjem kontrolnog uzorka vode smešom standarda pesticide, tako da krajnja masena koncentracija bude $0.01 \mu\text{g L}^{-1}$. Softverskim putem je izračunat odnos signal/šum u dobijenim hromatogramima za LOQ, a matematičkim putem su izračunate LOD vrednosti.

Ekstrakcija pesticida. Ekstrakcija pesticida iz uzoraka vode izvedena je metodom Milutinović i sar. (2012) na OASIS HLB kolonama, koje su aktivirane propuštanjem 5 mL metanola, a zatim 5 mL vode. Nakon kondicioniranja, propušteno je 250 mL uzoraka vode u koju je dodato po 100 μL svakog IS. Eluiranje analita je izvršeno propuštanjem 5 mL metanola. Ekstrakti su zatim upareni u struji azota i rastvoreni u mobilnoj fazi.

Uslovi hromatografskog razdvajanja. Prilikom analize vode korišćena je LC-MS/MS sa tabelarno prikazanim uslovima razdvajanja.

Tabela 1: Uslovi hromatografskog određivanja
Table 1. Terms of chromatographic determination

Instrument	Agilent 6410B QQQ
Kolona	XBridge C18, 150 x 3,0 mm, 3.5 μm , Waters
Jonski izvor	Multimod, MMI
Tip jonizacije	+ESI
Drying gas flow/drying gas temp.	5 ml/min./325°C
Vaporizer temp. / Nebulizer gas	220°C/48 psi
Opseg merenja mase	m/z 70-2000
Napon kapilare	2000 V
Autosampler	h-ALS-SLT, model G1367D
Zapremina injektovanja uzorka	Vinj=10 μl
Tip injektovanja	Sa ispiranjem/Bin/Pump-SL, model G1312B
Odnos mobilnih faza V/V	50/50
Protok	0.5 ml/min
Mobilna faza	A:0.1% HCOOH u MeOH; B:0.1% HCOOH u vodi
Odnos mobilne faze	A:B=70:30
Termostat i temp. kolone	Column-SL, Model G1316B, 40°C

Rezultati istraživanja i diskusija

Pre nego što se pristupi kalibraciji i kvantifikaciji pesticida, neophodno je postaviti akvizicione parametre masenog spektrometra - odrediti reakcije za praćenje jona (MRM) i naći energiju kolizione ćelije (CE), energiju fragmentacije (Frg) pri kojoj će odgovor ispitivanog pesticida biti najveći za date uslove.

Tabela 2: MRM prelazi (m/z) sa retencionim vremenima ispitivanih pesticida

Table 2. MRM gaps (m/z) with retention times of tasted pesticides

Pesticid	Formula	M (g/mol)	Prekursor jon	Produkt jon	Rt (min)
Izoproturon-D6	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O	206.28	207.0	165.0	11.72
			207.0	72.0	
Carbofuran-D3	C ₁₂ H ₁₂ D ₃ NO ₃	224.27	225.1	165	14.08
			225.1	123	
Atrazin-D5	C ₈ H ₈ D ₅ CIN ₅	220.71	216.0	174.0	10.29
			216.0	96.0	
Tiametoksam	C ₈ H ₁₀ CIN ₅ O ₃ S	291.71	292	211	9.23
			292	181	
Imidakloprid	C ₉ H ₁₀ CIN ₅ O ₂	255.66	256	208.7	3.30
			256	174.6	
Acetamiprid	C ₁₀ H ₁₁ CIN ₄	222.67	223.1	125.8	11.45
			223.1	55.7	

Prema Sanco Regulativi No 12571/2013, odstupanje internih standarda u uzorcima ne sme da prelazi 20%, u našem slučaju je ispunjen ovaj zahtev uzimajući u obzir da odstupanja korišćenih IS u proseku, ne prelaze 17.5%.

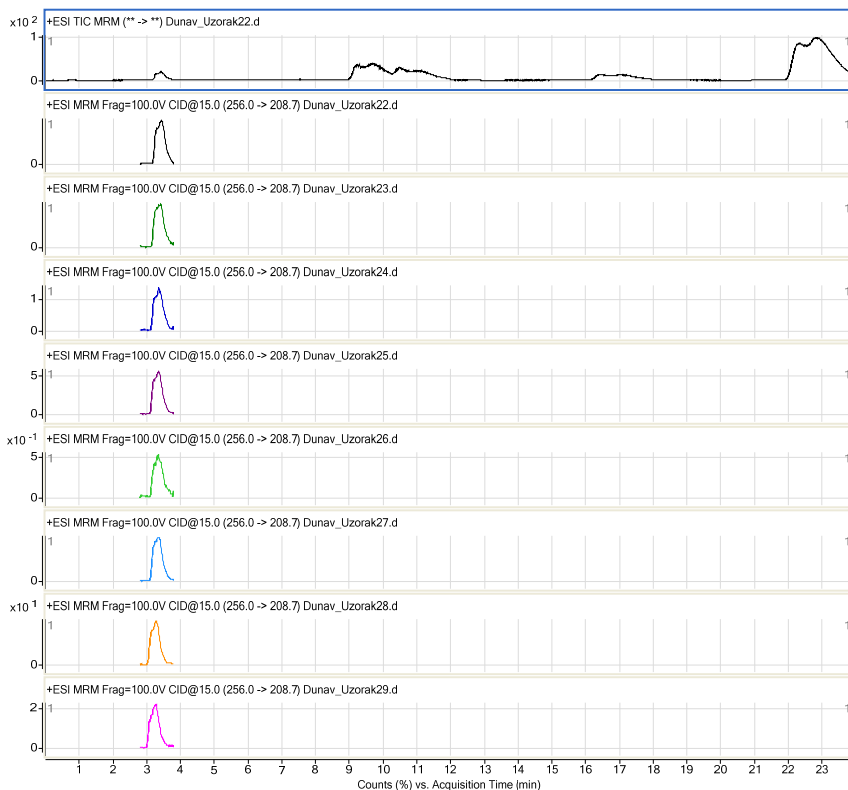
Parametri validacije

Kalibraciona kriva, LOD i LOQ. Hromatografsko snimanje kontrolnog uzorka vode, korišćenog za kalibraciju i proveru prinosa ekstrakcije je urađeno kako bi se potvrdilo odsustvo pesticida u njemu. Kalibraciona kriva „matrix-matched” standarda je obuhvatila pet koncentracionih nivoa u intervalu od 0.01-1.0 µg mL⁻¹. Postignuta je linearnost sa koeficijentom korelacije (R²) višim od 0.99 za sve ispitivane pesticide. Validacioni parametri sa niskim LOQ od 0.01 µg L⁻¹ potvrđuju da je metoda primenjiva za određivanje ostataka pesticida u vodi u skladu sa EU Regulativama.

Prinos ekstrakcije. Provera prinosa ekstrakcije je izvedena obogaćivanjem česemske vode na tri koncentraciona nivoa u tri ponavljanja uz dodavanje IS. Prosečani prinosi ekstrakcije ispitivanih pesticida su se kretali u intervalu od 78.4 do 123.5% sa RSD< 20% što je u skladu sa smernicama SANCO 12571/2013 dokumenta.

Analiza realnih uzoraka vode. Validovanom LC-MS/MS metodom određivanja ostataka pesticida u vodi, urađena je analiza uzoraka vode iz Dunava sa dva lokaliteta u Novom Sadu (45°15'59.0"N 19°51'51.0"E i 45°26'63.85"N 19°86'41.61"E).

LC-MS/MS analiza uzoraka vode Dunava, detektovala je imidakloprid u svim uzorcima.



Slika 3. Detekcije imidakloprida u svim analiziranim uzorcima
Graph 3. Dection of imidaclopride in all analyzed samples

Nakon izvršene kvantifikacije pesticida, preračunate su koncentracije detektovanih neonikotinoidea u uzorcima vode Dunava ($\mu\text{g/L}$). Nađene su niske koncentracije neonikotinoidea, u okviru propisanih vrednosti Direktive EU 495/2015.

Tabela 3. Detektovani ostaci pesticide u analiziranim uzorcima vode Dunava ($\mu\text{g L}^{-1}$)

Table 3. Pesticide residue detected in analyzed samples of Danube wather ($\mu\text{g L}^{-1}$)

Pesticid	Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 3	Uzorak 4	Uzorak 5	Uzorak 6	Uzorak 7	Uzorak 8
Tiametoksam	0.032	0.026	0.030	0.024	0.027	0.023	0.025	0.022
Imidakloprid	0.013	0.012	0.012	0.012	0.011	0.011	0.011	0.011
Acetamiprid	0.004	0.003	0.003	0.004	0.003	0.003	0.003	0.003

*Uzorci 1, 3, 5 i 7 su uzorkovani sa lokaliteta 45°26'63.85"N 19°86'41.61"E, dok su 2, 4, 6 i 8 sa 45°15'59.0"N 19°51'51.0"E

Zaključak

Direktiva EU 495/2015 proširuje standarde koji se odnose na kvalitet životne sredine u oblate zaštite površinskih voda, uključujući, pored ostalih pesticida, grupu neonikotinoidnih insekticida. LC-MS/MS analiza uzoraka vode Dunava, detektovala je veoma niske koncentracije imidakloprida, tiametoksama i acetamiprida u svim uzorcima. Rezultati rada ukazuju na potrebu stalnog monitoringa površinskih voda, pogotovo ukoliko će se vode koristiti za rekreaciju i navodnjavanje poljoprivrednih proizvoda.

Napomena

Istraživanja u ovom radu deo su projekta TR 43005, koji finansira Ministarstvo prosvete i nauke Republike Srbije.

Literatura

- Antić N., Radišić M., Radović T., Vasiljević T., Grujić S., Petković A., Dimkić M., Laušević M. (2013). Pesticide residues in the Danube River Basin in Serbia—a survey in 2009–2011, *CLEAN – Soil, Air, Water*, 43 (2), 197–204.
- Bursić V., Gvozdenac S., Vuković G., Pucarević M., Lazić S., Vuković S., Zeremski T., Indić D. (2013). Comparative study of pesticide residue levels in water from irrigation canal with LC-MS/MS and biological methods, 3rd International Conference of Ecology “Essays on Ecosystem and Environmental Research”, May 31- June 5.2013. Tirana, Albania, Proceeding book, 870-874.
- European Union, Directive 2015/495/EC of the European Parliament and of the Council, Official Journal of the European Communities, L348.
- Ismail B. S., Siti Humaira Haron, Mohd. Talib Latif (2012). Pesticide pesidue levels in the surface water of the irrigation canals in the muda irrigation Scheme Kedah, Malaysia, *International Journal of Basic & Applied Sciences IJBAS*, 12, 6, 85-90.
- Milutinović V., Vuković G., Matović V., Špirović B. (2012). Liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of pesticide residues in surface water on the territory of Belgrade, *Annual MGPR Meeting: Moving towards a sustainable agriculture*, Belgrade, Serbia 11-12 October, Book of Abstracts, pp: 74.
- Mladenović-Ranisavljević I., Takić Lj., Vuković M., Nikolić D., Živković N., Milosavljević P. (2012). Multi-criteria ranking of the Danube water quality on its course through Serbia. *Serbian J Manag* 7(2): 299–307.
- SANCO 12571/2013. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed.

IMPLEMENTATION OF EU DIRECTIVE 495/2015 IN DANUBE WATER MONITORING

*Vojislava Bursić, Gorica Vuković, Zoran Stojanović, Sonja Gvozdenac,
Tijana Zeremski, Maja Meseldžija, Aleksandra Petrović*

Abstract

The Directive of the EU 495/2015 concerning the list of pesticides, the monitoring of which is necessary in the estimation of ecological water quality, includes neonicotinoids, as well. By the LC-MS/MS analysis of the samples from the Danube the residues of thiamethoxam, acetamiprid and imidacloprid were detected. The detection of insecticides from the neonicotinoid group points at the necessity of the implementation of the Directive in the water quality monitoring.

Key words: water, Danube, EU Directives, neonicotinoides, LC-MS/MS